

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(1)Publication number : 09-033504  
(4)Date of publication of application : 07.02.1997

(51)IntCl

G01N 80/48  
G01N 80/98  
G01N 33/543

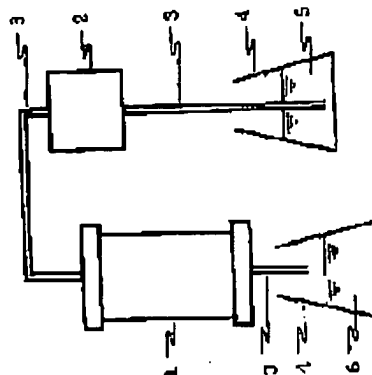
(21)Application number : 07-189576 (71)Applicant : NIKON CORP  
(22)Date of filing : 25.07.1995 (72)Inventor : FUJISAKI HISAO

(54) IMMUNOCHROMATOGRAPHY COLUMN, PRODUCTION AND USING METHOD THEREOF

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a production method and using method of immunochromatography column for refining a desired protein sample at high purity without causing any damage.

SOLUTION: The inventive method comprises a step for feeding a protein sample 5 containing a desired protein and an impurity protein to an immunochromatography column 1 which can refine a desired protein, produced by filling a carrier fixed with a polyclonal antibody prepared using the impurity protein in the sample 5 as an antigen, at high purity with no damage. The method further comprises a step for adsorbing an impurity protein to the immunochromatography column 1 to discharge and collect a desired protein 6, and a step for feeding a high acidity liquid to a refined immunochromatography column and discharging the adsorbed impurities and feeding a physiologic liquid so that the refined immunochromatography column can be used again. These steps can realize a method for using an immunochromatography column to refine a desired protein at high purity without causing any damage.





(2)

特開平9-33504

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 所望の蛋白質と不純物蛋白質を含む蛋白質試料中の前記不純物蛋白質を抗原として作製したポリクローナル抗体を固定した担体を充填してなる、前記所望の蛋白質を高純度かつ無傷にて精製可能なイムノクロマトグラフィカラム。

【請求項2】 少なくとも、  
所望の蛋白質と反応するモノクローナル抗体を得る工程と、  
前記モノクローナル抗体を用いて前記所望の蛋白質を含む試料中に存在する不純物蛋白質を採り出す工程と、  
前記不純物蛋白質を用いて、該不純物蛋白質と反応するポリクローナル抗体を得る工程と、  
前記ポリクローナル抗体を担体に固定する工程と、  
前記ポリクローナル抗体を固定した担体をイムノクロマトグラフィカラムに充填する工程と、を備えた前記所望の蛋白質を高純度かつ無傷にて精製可能なイムノクロマトグラフィカラムの製造方法。

【請求項3】 少なくとも、  
所望の蛋白質を含む蛋白質試料を用意する工程と、  
物理的または化学的性質の差を利用した精製法の組合せにより、前記蛋白質試料から不純物蛋白質を除去することにより、前記所望の蛋白質を高純度にて抽出する工程と、  
前記高純度にて抽出した蛋白質を動物に注射して所定期間経過後に、該動物から抗体産生リンパ球を採り出して前記動物の骨髓細胞と細胞融合させ、かつ融合細胞を増殖させる工程と、  
前記増殖させた融合細胞から前記所望の蛋白質と反応する抗体を産生する細胞を選択して増殖させ、かつ増殖細胞から放出されたモノクローナル抗体を回収する工程と、  
前記モノクローナル抗体を担体に固定してから該担体をカラムに充填する工程と、  
前記所望の蛋白質を高純度にて含む蛋白質試料を前記カラムに流して、前記所望の蛋白質を該カラムに吸着させ、かつ流出する複種類の不純物蛋白質を採り出す工程と、  
前記採り出した不純物蛋白質を動物に注射して所定期間経過後に、該動物から抗体産生リンパ球を採り出して前記動物の骨髓細胞と細胞融合させ、かつ融合細胞を増殖させる工程と、  
前記増殖させた融合細胞から、前記不純物蛋白質と反応する抗体を産生する細胞を選択して増殖させ、かつ増殖細胞から放出されたポリクローナル抗体を回収する工程と、  
前記ポリクローナル抗体を担体に固定してから該担体をカラムに充填する工程と、を備えた前記所望の蛋白質を高純度かつ無傷にて精製可能なイムノクロマトグラフィカラムの製造方法。

2

## 【請求項4】 少なくとも、

所望の蛋白質と不純物蛋白質を含む蛋白質試料中の前記不純物蛋白質を抗原として作製したポリクローナル抗体を固定した担体を充填してなる、前記所望の蛋白質を高純度かつ無傷にて精製可能なイムノクロマトグラフィカラムに、所望の蛋白質と不純物蛋白質を含む蛋白質試料を流入する工程と、

前記イムノクロマトグラフィカラムに前記不純物蛋白質を吸着させ、かつ前記所望の蛋白質を流出させて回収する工程と、  
精製終了後のイムノクロマトグラフィカラムに酸性度の高い液を流して、吸着した不純物を流出させてから生理的条件の液を流すことにより、精製終了後のイムノクロマトグラフィカラムを再使用可能とする工程と、を備えた前記所望の蛋白質を高純度かつ無傷にて精製可能なイムノクロマトグラフィカラムの使用法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、生化学、生物物理学、遺伝子工学等において、ある程度精製された蛋白質試料をさらに高純度かつ無傷にて精製するのに用いるイムノクロマトグラフィカラム、その製造方法及び使用方法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】 蛋白質の性質や構造を研究するには、対象となる蛋白質の試料を高純度に調製することが必要である。遺伝子工学技術において、遺伝子を組み込んだ大腸菌などを大量培養した培地から蛋白質を回収する際にも、目的の蛋白質を精製しなければならない。特に人に投与するインシュリンのような蛋白質の場合には、少量の不純物が重大な事態を引き起こすことがあるので、厳密な精製が必要である。

【0003】 蛋白質の調製方法としては、様々な方法（例えば遠心分離法、密度勾配遠心分離法、硫酸沈澱法、等電点沈澱法等）が古くから用いられ、イオン交換カラムクロマトグラフィやモレキュラーサイズカラムクロマトグラフィ等のクロマトグラフィ技術の出現により精製度が飛躍的に高まった。現在では、これらの方法のいくつかが組み合わせられて用いられているが、蛋白質試料の使用目的によっては精製度が十分ではない。

【0004】 例えば、蛋白質の三次元構造を決定するのにX線回折法が用いられるが、X線回折用の試料は、結晶でなければならない。構造決定に必要なデータを収集するための照射X線量は結晶の大きさに依存し、結晶が十分に大きくないと必要なデータを得る前に試料が壊れてしまう。ここで、生成できる蛋白質結晶の大きさは原料の蛋白質の純度に依存するので、蛋白質の三次元構造決定には、試料蛋白質の高純度精製が必須の条件になる。

【0005】 蛋白質試料の純度を高めるだけなら、近年

(3)

特開平9-33504

3

開発されたモノクローナル抗体カラムクロマトグラフィ法が使用できる。例えば、従来の方法により、かなりの程度まで精製した蛋白質試料をマウスやウサギに注射して一定期間飼育し、脾臓から脾細胞すなわち抗体産生リンパ球を採り、これと骨髓細胞とをポリエチレングリコール存在下で細胞融合させる。

【0006】そして、HAT（ヒポサチン、アミノプテリン、チミジン）培地中で培養することにより融合細胞だけを増殖させる。増殖した融合細胞から、限界希釈法でクローニングして目的（所望）の蛋白質と反応する抗体を産生する細胞を選び出し、この細胞を増殖させ、細胞外に放出される抗体を回収する。これは目的の蛋白質とだけ反応するモノクローナル抗体である。

【0007】このモノクローナル抗体を固定した担体を充填したカラムに、従来の方法によりかなりの程度まで精製した蛋白質試料を流すと不純物は流出し、所望の蛋白質だけが吸着されてカラム内に残る。そして、カラムに酸性度の高い液を流すことにより、目的の蛋白質を抗体からはずしてカラム外に流出させて回収する。このようにして蛋白質試料の純度を高めるのが、モノクローナル抗体カラムクロマトグラフィ法である。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】前述したように、目的（所望）の蛋白質は、カラムから回収する際に、高酸性度という過酷な状態にさらされる。そのため、回収後所望の蛋白質を速やかに生理的な条件に戻すのであるが、蛋白質の種類によっては変性して3次元構造を保持できないものが出てくるという問題点がある。

【0009】変性により3次元構造を保持できなくなった蛋白質試料でも、純度は非常に高いので、その蛋白質の1次元構造、すなわちアミノ酸配列を決定する試料として使用できるが、3次元構造を決定する試料としては使用できないという問題点がある。また、その蛋白質の機能を確認する試料としても使えないという問題点があった。

【0010】本発明は、かかる問題点に鑑みてなされたものであり、所望の蛋白質試料を高純度かつ無傷にて精製できるイムノクロマトグラフィカラム、その製造方法及び使用方法を提供することを目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】そのため、本発明は第一に「所望の蛋白質と不純物蛋白質を含む蛋白質試料中の前記不純物蛋白質を抗原として作製したポリクローナル抗体を固定した担体を充填してなる、前記所望の蛋白質を高純度かつ無傷にて精製可能なイムノクロマトグラフィカラム（請求項1）」を提供する。

【0012】また、本発明は第二に「少なくとも、所望の蛋白質と反応するモノクローナル抗体を得る工程と、前記モノクローナル抗体を用いて前記所望の蛋白質を含む試料中に存在する不純物蛋白質を採り出す工程と、前

4

記不純物蛋白質を用いて、該不純物蛋白質と反応するポリクローナル抗体を得る工程と、前記ポリクローナル抗体を担体に固定する工程と、前記ポリクローナル抗体を固定した担体をイムノクロマトグラフィカラムに充填する工程と、を備えた前記所望の蛋白質を高純度かつ無傷にて精製可能なイムノクロマトグラフィカラムの製造方法（請求項2）」を提供する。

【0013】また、本発明は第三に「少なくとも、所望の蛋白質を含む蛋白質試料を用意する工程と、物理的または化学的性質の差を利用した精製法の組合せにより、前記蛋白質試料から不純物蛋白質を除去することにより、前記所望の蛋白質を高純度にて抽出する工程と、前記高純度にて抽出した蛋白質を動物に注射して所定期間経過後に、該動物から抗体産生リンパ球を採り出して前記動物の骨髓細胞と細胞融合させ、かつ融合細胞を増殖させる工程と、前記増殖させた融合細胞から前記所望の蛋白質と反応する抗体を産生する細胞を選択して増殖させ、かつ増殖細胞から放出されたモノクローナル抗体を回収する工程と、前記モノクローナル抗体を担体に固定してから該担体をカラムに充填する工程と、前記所望の蛋白質を高純度にて含む蛋白質試料を前記カラムに流して、前記所望の蛋白質を該カラムに吸着させ、かつ流出する複数種類の不純物蛋白質を採り出す工程と、前記採り出した不純物蛋白質を動物に注射して所定期間経過後に、該動物から抗体産生リンパ球を採り出して前記動物の骨髓細胞と細胞融合させ、かつ融合細胞を増殖させる工程と、前記増殖させた融合細胞から、前記不純物蛋白質と反応する抗体を産生する細胞を選択して増殖させ、かつ増殖細胞から放出されたポリクローナル抗体を回収する工程と、前記ポリクローナル抗体を担体に固定してから該担体をカラムに充填する工程と、を備えた前記所望の蛋白質を高純度かつ無傷にて精製可能なイムノクロマトグラフィカラムの製造方法（請求項3）」を提供する。

【0014】また、本発明は第四に「少なくとも、所望の蛋白質と不純物蛋白質を含む蛋白質試料中の前記不純物蛋白質を抗原として作製したポリクローナル抗体を固定した担体を充填してなる、前記所望の蛋白質を高純度かつ無傷にて精製可能なイムノクロマトグラフィカラムに、所望の蛋白質と不純物蛋白質を含む蛋白質試料を流入する工程と、前記イムノクロマトグラフィカラムに前記不純物蛋白質を吸着させ、かつ前記所望の蛋白質を流出させて回収する工程と、精製終了後のイムノクロマトグラフィカラムに酸性度の高い液を流して、吸着した不純物を流出させてから生理的條件の液を流すことにより、精製終了後のイムノクロマトグラフィカラムを再使用可能とする工程と、を備えた前記所望の蛋白質を高純度かつ無傷にて精製可能なイムノクロマトグラフィカラムの使用方法（請求項4）」を提供する。

【0015】

(4)

特開平9-33504

5

【作用】本発明のイムノクロマトグラフィカラムは、所望の蛋白質と不純物蛋白質を含む蛋白質試料中の前記不純物蛋白質を抗原として作製したポリクローナル抗体を固定した担体を充填してなるので、所望の蛋白質と不純物蛋白質を含む蛋白質試料から所望の蛋白質を高純度かつ無傷にて精製できる。

【0016】以下に、本発明のイムノクロマトグラフィカラムを製造する方法の態様（一例）を示すが、本発明はこの態様に限定されるものではない。まず最初に、以下のようにして目的の蛋白質のモノクローナル抗体を得る。すなわち、遠心分離法、密度勾配遠心分離法、硫酸沈澱法、等電点沈澱法、イオン交換カラムクロマトグラフィ、モレキュラシーブカラムクロマトグラフィ等の従来の物理的または化学的な性質の違いを利用する蛋白質の精製法の組み合わせを用いて、かなり高純度の蛋白質試料を得る。

【0017】この高純度蛋白質試料をマウスやウサギに注射して一定期間飼育し、脾臓から脾細胞すなわち抗体産生リンパ球を採り、これと骨髓種細胞とをポリエチレングリコール存在下で細胞融合させる。そして、HAT培地中で培養することにより融合細胞だけを増殖させる。増殖した融合細胞から、限界希釈法によりクローニングして目的（所望）の蛋白質と反応する抗体を産生する細胞を選び出して増殖させ、細胞外に放出されたモノクローナル抗体を回収する。

【0018】次に、以下のようにして不純物に含まれる幾種類かのすべての蛋白質と反応するポリクローナル抗体を得る。すなわち、前記工程で得られたモノクローナル抗体を担体に固定し、その担体をカラムに充填する。このカラムに、従来の方法によりかなりの程度まで精製した蛋白質試料を流すと、不純物は流出して所望の蛋白質だけが吸着され、カラム内に残る。流出した不純物は、所望の蛋白質を含んでいない。

【0019】この不純物をマウスやウサギに注射し、一定期間飼育してから脾臓中のリンパ球を採り出し、骨髓種細胞と融合させて融合細胞をつくる。この融合細胞を培養して細胞外に放出された抗体を回収する。この抗体は、注射された不純物に含まれる幾種類かのすべての蛋白質のそれぞれと反応する抗体が混合されたポリクローナル抗体である。

【0020】最後に、このポリクローナル抗体を担体に固定し、その担体をカラムに充填することにより、本態様のイムノクロマトグラフィカラムが作製される。このカラムに、従来の方法により、かなりの程度まで精製した蛋白質試料を流すと、不純物は吸着されてカラム内に残り、所望の蛋白質だけが流出する（これを回収する）。このようにして得た蛋白質試料は、抗体からはずすための過剰な処理を受けていないので無傷であり、また抗原抗体反応で不純物が除去されているので純度が高い。

6

【0021】なお、使用したイムノクロマトグラフィカラムは、酸性度の高い液を流して結合した不純物を流出させてから生理的條件の液を流すことにより、再使用可能となる。以下、本発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明はこの例に限定されるものではない。

【0022】

【実施例】本発明の一実施例として、アメーバの一種であるアカンタアメーバ内の運動性タンパク質ミオシンⅠAを高純度かつ無傷に精製できるイムノクロマトグラフィカラム、その製造方法及び使用方法について示す。培養液を遠心して、沈澱として回収したアカンタアメーバ細胞をホモジナイザで粉砕し、内容物を遠心の上澄みとして得る。これをDE52陰イオン交換カラムに吸着させ、濃度勾配塩化カリウム溶液で流出させ、不純物と分離して回収する。

【0023】透析によりイオン強度を下げ、沈澱物を遠心により除去し、ホスホセルロースカラムに吸着させ、濃度勾配塩化カリウム溶液で流出させ、不純物と分離して回収する。このとき、別の運動性タンパク質ミオシンⅠBとも分離される。ミオシンⅠAを含む分画を透析によりイオン強度を下げ、ADPアガロースカラムに吸着させ、濃度勾配塩化カリウム溶液で流出させ、不純物と分離して回収する。透析によりイオン強度を下げ、ハイドロキシルアパタイトカラムに吸着させ、濃度勾配塩化カリウム溶液で流出させ、不純物と分離して回収する。

【0024】透析によりイオン強度を下げ、透析バッグに入れたまま蔗糖粒の中に埋めて水を吸い出させた後、透析バッグの容積を減らし、低張液に透析して蔗糖を希釈することにより高濃度試料溶液を得る。このように、4種類のカラムクロマトグラフィによって精製されたミオシンⅠA試料溶液は、わずかに不純物を含んでいる。これを一次精製ミオシンⅠA試料溶液とする。

【0025】この一次精製ミオシンⅠA試料溶液の一部をマウスに注射し、3週間後にさらに注射する。採血して血清を得て、試料溶液との抗原抗体反応が起こることを確認してから脾臓を摘出する。脾臓から脾細胞すなわち抗体産生リンパ球を採り、これと骨髓種細胞とをポリエチレングリコール存在下で細胞融合させる。そして、HAT培地中で培養することにより融合細胞だけを増殖させる。

【0026】増殖した融合細胞から、限界希釈法によりクローニングしてミオシンⅠAに反応する抗体を産生する細胞を選び出し、この細胞を増殖させて抗体を得る。これはミオシンⅠAにだけ反応する抗ミオシンⅠAモノクローナル抗体である。このモノクローナル抗体を担体に固定し、カラムに充填して、ミオシンⅠAアフィニティイムノクロマトグラフィカラムを作製する。

【0027】これに一次精製ミオシンⅠA試料溶液を流すと、不純物は流出し、ミオシンⅠAだけが吸着されてカラム内に残る。流出した不純物溶液は、ミオシンⅠA

50

(5)

特開平9-33504

7

8

を含んでいない。この不純物溶液の一部をマウスに注射し、3週間後にさらに注射する。採血して血清を得て、不純物溶液との抗原抗体反応が起こることを確認してから脾臓を摘出する。

【0028】脾臓から脾細胞すなわち抗体産生リンパ球を採り、これと骨髓種細胞とをポリエチレングリコール存在下で細胞融合させる。そして、HAT培地中で培養することにより融合細胞だけを増殖させる。増殖した融合細胞から抗体を得る。この抗体は、不純物溶液に含まれる幾種類かのすべての蛋白質のそれぞれと反応する抗体が混合されたポリクローナル抗体である。

【0029】このポリクローナル抗体を担体に固定し、その担体をカラムに充填することにより、ミオシンⅠAを高純度かつ無傷にて精製できるイムノクロマトグラフィカラムが製造される。次に、図1を引用して、このカラムの使用例を説明する。ポンプ2により一次精製ミオシンⅠA試料溶液5をカラム1に流入させると、不純物は抗原抗体反応によりカラム1に吸着され、ミオシンⅠAだけが流出して高純度かつ無傷な状態にてミオシンⅠA試料溶液6が得られる。

【0030】このカラム1は、使用後、酸性度の高い液\*

\*を流して結合した不純物を流出させてから生理的条件下の液を流すことにより、再使用可能となる。

【0031】

【発明の効果】以上説明したように、本発明のイムノクロマトグラフィカラム及びその使用方法によれば、所望の蛋白質と不純物蛋白質を含む蛋白質試料から所望の蛋白質を高純度かつ無傷にて精製できる。また、本発明のイムノクロマトグラフィカラムの製造方法によれば、前記優れた特性を有するイムノクロマトグラフィカラムを得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】は、実施例のイムノクロマトグラフィカラムを実際に使用した例を示す概略構成図である。

【符号の説明】

- 1 イムノクロマトグラフィカラム
- 2 ポンプ
- 3 チューブ
- 4 試料容器
- 5 不純物を含む一次精製蛋白質試料溶液
- 6 高純度無傷精製された蛋白質試料溶液

【図1】

